

BRAIN PRESSURE AND INTRA-OCULAR TENSION DEPRESSING AGENT

Publication number: JP63230627

Publication date: 1988-09-27

Inventor: NAKAYAMA KUNIO; KUMAKURA TOYOAKI;
IWAMOTO MITSUO; YAMAMOTO FUMIHIRO;
MOTOYOSHI YOSHIE; YAMAMOTO SHUICHI;
TATEISHI TAKASHI; HIRAO AKINORI; YAMAMOTO
MASAYUKI; KATO TAKAHARU; SANO TETSURO

Applicant: NIKKEN CHEMICALS CO LTD

Classification:

- international: **A61K31/045; A61K31/047; A61P9/00; A61P27/02;
A61P43/00; C07C31/24; A61K31/045; A61P9/00;
A61P27/00; A61P43/00; C07C31/00; (IPC1-7):
A61K31/045; C07C31/24**

- European:

Application number: JP19870062568 19870319

Priority number(s): JP19870062568 19870319

Report a data error here

Abstract of JP63230627

PURPOSE: To obtain the titled depressing agent containing erythritol as an active ingredient and having strong brain pressure and intra-ocular tension depressing action. **CONSTITUTION:** Erythritol is contained as an active ingredient. The aimed depressing agent is used normally in form of injection or oral medicine. When the agent is used as the injection, the agent obtained by preparing the agent to about 10-40% (W/V) concentration using distillation water for injection and formulating the agent according to a conventional method is used and in case of the oral medicine, the medicine is used as a liquid agent or powder agent having high concentration and they are each administered in dose of 0.3-3g/1kg wt. of the body/day 1-3 times calculated in terms of erythritol.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-230637

⑬ Int. Cl.⁴
A 61 K 37/02

識別記号
ABE
ADT
ADU

庁内整理番号
8615-4C

⑭ 公開 昭和63年(1988)9月27日

審査請求 未請求 発明の数 3 (全9頁)

⑮ 発明の名称 金属触媒による酸化被害の予防へのチオレドキシン化合物類の利用

⑯ 特 願 昭62-55458

⑰ 出 願 昭62(1987)3月12日

優先権主張 ⑱ 1986年3月14日⑲ 米国(US)⑳ 839857
㉑ 1986年10月20日㉒ 米国(US)㉓ 921287

㉔ 発 明 者 ビンセント ビー ビ アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウィンチエスター
ジェ

㉕ 発 明 者 シンシア デイー ミ アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 リン
リス

㉖ 出 願 人 レプリゲン コーポレ アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ州 カンブリ
ーション ツジ ビルディング700 ワン ケンダールスクエア
(番地なし)

㉗ 代 理 人 弁理士 佐々井 弥太郎 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

金属触媒による酸化被害の予防へのチオレドキシン化合物類の利用

2. 特許請求の範囲

1. 金属触媒による酸化被害を受ける系において、酸化防止有効量のチオレドキシン化合物又はその塩を使用することからなる、金属触媒による酸化被害の予防法。

2. チオレドキシン化合物の酸化防止有効量が約1μMないし約100 μMである、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

3. チオレドキシン化合物が、本質的に大腸菌チオレドキシンの臭化シアノゲン類似でつくられる残基1-37を含有する断片からなるチオレドキシン誘導ジチオールペプチドである、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

4. チオレドキシン化合物が、本質的に大腸菌チオレドキシンの臭化シアノゲン類似で残基1-37をつくってから、これをトリプシンで消化させて

つくった残基19-38を含有する断片からなるチオレドキシン誘導ジチオールペプチドである、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

5. チオレドキシン化合物が、酸化還元活性ペプチド配列のCys-X-Y-Cys-Lys又はCys-X-Y-Cys又はTrp-Cys-X-Y-Cys-Lys[ここでXとYは20個のアミノ酸の任意のものでありうる。]を含むチオレドキシンで誘導された、又はチオレドキシン様のジチオールペプチドである、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

6. チオレドキシン化合物が、酸化還元活性ペプチド配列のA-Cys-X-Y-Cys-Lys-B又はA-Cys-X-Y-Cys-B又はA-Trp-Cys-X-Y-Cys-Lys-B[ここでXとYは20個のアミノ酸の任意のものであり、Aはアミノ封鎖基、Bはカルボキシル封鎖基である。]を含むチオレドキシンで誘導された、又はチオレドキシン様のジチオールペプチドである、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

7. 酸化還元活性ペプチド配列がCys-Gly-Pro-Cys-Lys又はCys-Gly-Pro-Cysである、特許請求の

範圍第5項又は第8項に記載の方法。

8. 酸化還元活性ペプチド配列がTrp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lysである、特許請求の範圍第5項又は第8項に記載の方法。

9. チオレドキシン化合物が、大腸菌からのチオレドキシンである、特許請求の範圍第1項に記載の方法。

10. チオレドキシン化合物が哺乳類チオレドキシンである、特許請求の範圍第1項に記載の方法。

11. チオレドキシン化合物又はその塩の酸化防止有効量が、金属触媒による酸化被害を受ける生物系で金属触媒による酸化を阻止するために使用される、特許請求の範圍第1項に記載の方法。

12. 生物系が溶液中又は膜内の脂質である、特許請求の範圍第11項に記載の方法。

13. チオレドキシン化合物が産血の処置に使用される、特許請求の範圍第11項に記載の方法。

14. チオレドキシン化合物が食品、薬品及び化粧品への酸化被害の予防に使用される、特許請求の範圍第11項に記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明は金属触媒による酸化被害を予防するためのチオレドキシン化合物類の利用に関する。

【先行技術及び問題点】

酸素産生基(オキシラジカル)は、酸素の部分還元型である。遷移金属触媒は、酸化被害を開始するオキシラジカルの発生に、不可欠な役割をもっていると考えられる。オキシラジカルは、炎症、産血後の組織損傷、老化、発癌性(すなわちDNA損傷)、薬剤作用と薬剤毒性、脂質過酸化、及びタンパク劣化を含めた病つかの生物学的反応と病状に関与していた。オキシラジカルの検討には、ギルバート・ディー・エル(Gilbert, D.L.)編(1981年)「酸素と生命過程」(Oxygen and Living Processes);学術的方法、スプリングー・フェアラグ社、ニューヨーク;ハリウェル・ビー(Hallivell, B.)及びガッターリッジ・ジェイ・エム・シー(Gutteridge, J.M.C.)(1984年)、Biochem. J. 218巻1-14頁;オースト・エス・ディー(Aust, S.

15. チオレドキシン化合物が炎症症状の処置に使用される、特許請求の範圍第11項に記載の方法。

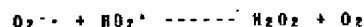
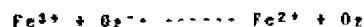
16. 酸化還元活性ペプチド配列のTrp-Cys-X-Y-Cys-Lys[ここでXとYは20個のアミノ酸の任意のものでありうる]を含む、チオレドキシンで誘導された、又はチオレドキシン様のジチオールペプチド。

17. 酸化還元活性ペプチド配列のA-Trp-Cys-X-Y-Cys-Lys-B[ここでXとYは20個のアミノ酸の任意のものであり、Aはアミノ封鎖基、Bはカルボキシル封鎖基である]を含むチオレドキシンで誘導された、又はチオレドキシン様のジチオールペプチド。

18. 酸化還元活性ペプチド配列のTrp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lysを含む、特許請求の範圍第16項又は第17項に記載のチオレドキシンで誘導された、又はチオレドキシン様のジチオールペプチド。

D.), モアハウス・エル・エイ(Morehouse, L.A.)及びトーマス・シー・イー(Thomas, C.E.)(1985年) J. Free Radical Biol. and Med. 1巻3-25頁;及びシーズ・エッチ(Seis, H.)編(1985年)「酸化ストレス」(Oxidative Stress)アカデミックプレス社、ニューヨーク・ロンドン)を参照のこと。

酸素及び酸素の部分還元型(すなわち超過酸化物 $O_2^{\cdot-}/HO$ 、過酸化水素 H_2O_2 、及びヒドロキシルラジカル $\cdot OH$)と遷移金属との化学は、主に鉄と銅で研究されてきた。超過酸化物の発生は、化学的あるいは酵素的に、金属触媒によるハーバー・ワイス反応(又は $O_2^{\cdot-}$ によるハーバー・ワイス)に関与しているものと考えられる。



これらの反応は、遷移金属の不在下に無反応である(すなわち触媒されない反応の速度が遅い)と考えられる。エチレンジアミン四酢酸(EDTA)のようなある鉄キレート化剤は、恐らくは Fe^{3+} (第

二鉄型)をキレート化して、これを可溶型で保持することにより、鉄で触媒されるハーバー・ワイス反応を促進する。一方、デスフェリオキサミン(デスフェラール[®]メシレート、チバ・ガイギー、ニューヨーク州ホーソン)などの他のキレート化剤は、恐らくは Fe^{2+} の還元又は Fe^{2+} で触媒される H_2O_2 の分解を抑制することによって、鉄で触媒されるハーバー・ワイス反応を抑制する。幾つかのチオール化合物類と生物学的還元体(すなわちグルタチオン[GSH]、アスコルベート、ジチオスレイトール[DTT])は、種々の系で、鉄の還元を通して鉄で触媒されるハーバー・ワイス反応を促進するか、又は金属濃度よりかなり高い濃度でフリーラジカル反応を抑制することが示されている。【問題点を解決する手段】

本発明の新規方法は、例えば生物学的反応と疾病状態において金属触媒による酸化的損傷を予防するためにチオレドキシン化合物を使用することからなる。酸化的損傷反応(すなわちハーバー・ワイス)は開始のために金属触媒を必要とし、金

属の存在下の酸化によって不活性化されるようなタンパクその他生物学的に活性のある化合物類、例えば抗生物質とタンパク類の生物活性を保持するために使用できて有利である。チオレドキシンは食品や化粧品の一成分である脂質の過酸化を抑制するから、食品・化粧品業界で一般的酸化防止剤としてチオレドキシンを使用できる。

チオレドキシン化合物類は、汚染ないし添加遷移金属類、例えば鉄、銅、マンガン、バナジウム等の存在下に生物学的活性化合物の酸化による不活性化を予防するために、生体外の系で使用できる。このような生体外の系で使用できるチオレドキシン化合物の水準は、約 $1\mu M$ ないし約 $100\mu M$ の範囲にある。最濃使用水準は、当業者が容易に決定できる。この最濃水準は、存在する金属汚染水準に影響されよう。生物学的活性化合物の生物活性を維持するには、金属水準が高ければ、チオレドキシン化合物も高水準が必要となる。このため、生物活性の安定化が検定されるまで、任意所定の反応容器のアリコートに所定量のチオレドキシン化

属の不存在下では無反応と考えられるから、いかなる種類の酸化的損傷も、チオレドキシンにより、汚染金属の金属キレート化を経て、又はスルフィドリルや他のアミノ酸に固有の酸化防止性状によって抑制できる。(金属類は水中と生物系に遍在し、従って除去のための配慮をしなければ存在している)。更に詳しくは、本発明は金属濃度と同じ濃度のチオレドキシン化合物を使用して、溶液中又は膜内の金属触媒による脂質の過酸化を生体外で抑制することに関する。更に、溶液中の鉄及び銅との相互作用のためにチオレドキシンを使用できる。このように、この酸素と、本明細書で「チオレドキシン化合物」と呼ばれる類似配列をもったポリペプチド類とを、金属触媒による酸化的損傷又はストレス予防のため生体内外で使用できる。特定の例は虚血の金属キレート化療法用、薬剤作用又は毒性による脂質過酸化の抑制剤用、抗炎症剤用、及びDNA損傷の予防用などの用途を含む。更に、本明細書で明らかにされたチオレドキシン化合物類は、汚染ないし添加された遷移金

属で処理できることが明白である。次に生物活性を安定化させる有効量のチオレドキシン化合物を規模拡大して、反応容器中の生物活性化合物を安定化させる。生物学的活性化合物、例えば抗生物質やタンパク、ポリペプチドを同分系よりも連続基盤で生産する場合は、溜んでいる生成物の生物活性を安定化させるのに有効な量のチオレドキシン化合物を周知の手段によって生成物流に仕込むことができる。チオレドキシン化合物の仕込み量は、この場合も上記のように代表的試料で決定されよう。

上記のように生体内の種々の疾病状態の処置にチオレドキシン化合物類を使用するには、その病状にかかった人又は動物に、一般的には全身的に化合物類を投与することによって行なうことができる。特定投与方式は、特定疾病状態の性質と場所に依存していよう。例えば炎症状態の処置は、できるだけ炎症部位の近くで行なうのが有利である。炎症が関節炎の場合は、その部位への注射が一般に最も有効である。しかし、処置は鼻内、経

口、直腸、又は局所塗布で投与される製剤をも包含できる。概して投与方式は、類似疾病状態の処置に医薬品を投与するための既知手段に従う。使用できるチオレドキシン化合物水準は約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ないし約 $100\text{mg}/\text{kg}$ の範囲にある。

シロップ剤、エリキシル剤及び懸濁液のような経口投与のための流体単位適量形式をつくるには、組成物の茶匙1杯が所定量の投与チオレドキシン化合物を含有するものをつくる。チオレドキシン化合物を砂糖、風味料、及び防腐剤と一緒に水性ビヒクル中に溶解すると、シロップ剤ができる。エリキシル剤は風味料と一緒に適当な甘味料を加えたアルコール水溶液のビヒクルを使用してつくられる。

非経口投与には、流体単位適量形式は、チオレドキシン化合物と無菌ビヒクル（水が好適）を利用してつくられる。

チオレドキシン化合物を使用形式と濃度に応じてビヒクルに溶解できる。溶液をつくるには、チオレドキシン化合物を注射用水に溶解し、ろ過濾

してから、適当なバイアルやアンプルに充填し、密封できる。局所鎮痛剤、防腐剤及び緩衝剤のような助剤をビヒクルに溶解するのが有利である。チオレドキシンを還元型で有利に投与できる。還元型は、酸化型をジチオスレイトールのような任意の数の慣用のチオール還元体で処理することによって得られる。

経口及び非経口投与のほか、直腸及びちつつ経路を利用できる。チオレドキシン化合物を腸薬によって投与できる。ほぼ体温に融点をもつビヒクルか、溶けやすいビヒクルを利用できる。例えば、ココアバターと種々のポリエチレングリコール（カーボワックス）がビヒクルとして役立つ。

鼻内点滴注入には、流体単位適量形式はチオレドキシン化合物と、適当な薬学ビヒクル（水が好適）を利用するか、又は適気用乾燥粉末によってつくられる。

エアゾル用には、チオレドキシン化合物を気体又は液化推進剤、例えばジクロロジフルオロメタン、炭酸ガス、窒素、プロパン等と一緒に、また

必要ないし希望に応じて共溶媒と湿润剤のような通常の助剤を加えて、加圧エアゾル容器に包装することができる。

本明細書で使用される用語「単位適量形式」は、ヒト及び動物患者にとって単位適量に適した物理的に区分される単位であり、各単位は必要な薬学増量剤、担体又はビヒクルと組合わせて、望んでいる治療効果をつくりだすために計算された所定量のチオレドキシン化合物を含有している。本発明の新規な単位適量形式の仕様は、(a)活性材料すなわちチオレドキシン化合物の類のない特性と、達成すべき特定治療効果、及び(b)ヒトの治療用にこのような活性材料をコンバウンドする技術に固有の限界、に支配され直接に依存している。本発明による適当な単位適量形式の例は錠剤、カプセル剤、トローチ、歯薬、散薬包、ウェハー、カシェ剤、茶さじ、大さじ、滴びん、アンプル、バイアル、以上の任意のものの分離した複数のも、及び本明細書に記載された他の形式である。例えば、抗炎症剤として使用されるチオレドキシン化

合物は、この技術で入手の容易な薬学材料、また確立された手順でつくることができる薬学材料を使用して、単位適量形式で容易につくることができる。種々の適量形式に適したチオレドキシン化合物量を容易に決定できる。適当な適量の調整は、処置を受けるホストの年齢、体重、及び全体的状態を考慮して、処置症状の程度に見合うように容易に行なうことができる。

チオレドキシンはエルマンズ試薬又は種々の蛋白中に天然に存在するような典型的な有機化合物中のジスルフィドを還元する能力を有する低分子量のジチオール蛋白である。（ホルムグレン エー、[1981]Trends in Biochemical Science 6, 26-39）。

本発明の範囲内にあつてまとめてチオレドキシン化合物と呼ぶチオレドキシン及びチオレドキシンに由来するか又はチオレドキシン様のジチオールペプチドは以下の化合物によって例示される。
(1)大腸菌から単離されるチオレドキシン（ラウレント ティー・シー、モアー イー・シー、及びラ

イヒャード ビー.[1964] J. Biol. Chem. 239, 3436-3445)

(2)他の源から単離されるチオレドキシン類、例えば酵母から単離されるチオレドキシン(ボルケジー、ビー、バルデステン エー、及びライヒャード ビー.[1970]、J. Biol. Chem. 245, 2362-2379) ; *Cyanobacterium* (グリーンソン エフ、ケー、及びホルムグレン エー.[1983]『チオレドキシンズ、ストラクチャーアンドファンクション』[ビー、ガデル編] Editions du Centre National de la Recherche Scientifique) ; ラット(rat) (グエララ ジェー、モア イー、シー、及びワード ディー、エムエヌ.[1983]上記) ; T₄バクテリオファージ(ゾダーバーク B-D、スジョベルグ B-H、ゾンネルシュタム ユー、及びブランデン C-I[1978] Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5827-5830) ; 哺乳類チオレドキシンの精製(ルスハム エム、及びホルムグレン エー.[1982] Biochem. 121 : 6628-6633) ; 更に人を発源とするチオレドキシンを本発明で使用する事が出来る。

ールペプチド類。これらのチオレドキシン様のジチオールペプチドはレドックス活性ジスルフィドを形成する一対のシステイン残基を含有する特徴を一般に有する。この例には天然の源に由来するもの又は合成的に構成されたペプチドが含まれ、これは上に開示した同じレドックス活性ペプチド配列、例えば大腸菌チオレドキシン中のCys-Gly-Pro-Cys又はCys-Gly-Pro-Cys-Lys 又は Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys、又はT₄バクテリオファージによってコードされるような他のチオレドキシンからの類似配列Cys-Val-Tyr-Cys (Cys=システイン、Val=バリン、Tyr=チロシン)が含まれる。(ゾダーバーク B-D、スジョベルグ B-H、ゾンネルシュタム U、及びブランデン C-I [1978] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5827-5830)。他のチオレドキシン様のペプチドには固有のチオレドキシン様の活性を有するプロチオニン類と呼ばれる種蛋白質の類が含まれる(ワグ ケー、及びブヒヤナン ビー、ビー.[1983]『チオレドキシンズ、ストラクチャーアンドファンクション』、[ガデル ビー、編]

(3)上記実施例1に記載されるような無偏のチオレドキシンの開裂によって造られるペプチドを表しているチオレドキシンに由来するジチオールペプチド類。チオレドキシンに由来するこの類のそのような例の一つは1~37の残基(即ちT₁₋₃₇)を含有する断片であって大腸菌からのチオレドキシンのシアノゲンプロマイド開裂によってつくられるものを含有している断片である。これらのチオレドキシンに由来する、及びチオレドキシン様のジチオールペプチドの重要な特徴はこれらがレドックス活性ペプチド配列Cys-X-Y-Cys(ここでXとYは20のアミノ酸の任意のものである)を含有しているということである。例えば大腸菌チオレドキシンからのレドックス活性ペプチド配列はCys-Gly-Pro-Cys (Cys=システイン、Gly=グリシン、Pro=プロリン)である。またレドックス活性配列Cys-Gly-Pro-Cys-Lys 又は Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lysを使用できる(Lys=リジン)。

(4)なかでも蛋白質ジスルフィドの還元を触媒する固有の能力を有するチオレドキシン様のジチオ

Editions du Centre National de la Recherche Scientifique)。

チオレドキシンは大腸菌菌株Bの市販の源から(グレインブロセッシングコーポレーション、ミネソタ州ミネアポリス)又は標準の手順によって成育される一般の大腸菌株の幾つかの任意のものから(ビジェット プイ、及びコンレイ アール、アール[1977] J. Biol. Chem. 252, 6367-6372)の何れかから精製される。蛋白質はイオン交換及び分子篩カラム上のクロマトグラフィを含む標準の手順を用いて精製される(ウィリアム シー、エッチ、ジャネッティ ジー、アルスコット エル、ディー、及びマックアリスター ジェー、ケー.[1967] J. Biol. Chem. 242, 5228-5231; マックエボイ エム、ランツ シー、ルン シー、エー、及びビジェット プイ.[1981] J. Biol. Chem. 256, 6646-6650)。

チオレドキシン蛋白質は上記マックエボイ等に記載されるように定量的なロケット免疫電気泳動を用いて免疫的に検定される。

以下は本発明を説明する最良の態様を含んだ実施例である。これらの実施例は制限するものと解釈すべきでない。全ての溶液混合物割合は他に記載されていなければ容量による。

実施例1 チオレドキシン断片T 1-37とT 18-38 (a)シアノゲンプロマイド開裂でのT 1-37の製造

大腸菌チオレドキシンの試料を水中で12時間5℃で透析した。5mlを乾燥し70%塩酸中に再懸濁した。シアノゲンプロマイド(シグマケミカル)を70%塩酸中に溶解し、50倍モル過剰のメチオニン中のチオレドキシンに加えた。溶液を室温でバースし、室温で暗いなかで24時間培養した。開裂反応の完了時に溶液を室温下で乾燥し、酢酸ナトリウム緩衝液中に再懸濁し、pH8.5に水酸化アンモニウムで調整した。

試料をバックマンモデル421装置(カリフォルニア州フラートンのバックマンインストラメンツインコーポレーテッドの商標)に取り付けられたウォーターズμ-ボンダパック(Vaters μ-Bondapak)C-18カラム(マサチューセッツミルフォー

でpH 8.0に調節した。トリプシンの一部分(シグマケミカル)を培養に1%(w/v)のペプチド濃度で加えた。反応混合物を37℃で1時間培養した。トリプシン断片の分離をHPLCでシアノゲンプロマイド断片に対すると同じ様に行った。

T 1-37ペプチドのトリプシン消化は二つのペプチド、即ちT 4-18及びT 18-38を生成し、これらはHPLCで31%及び45%の緩衝液B中で夫々分離して分割された。アミノ酸分析は31% Bに於いて分離される種類のものが15のアミノ酸を含有し、活性部位ペプチドT 18-38に対応していることを明らかにした。90nモルのT 1-37の培養は80nモルのT 18-38をHPLCでの分離の後収率88%で造った。

実施例2

脂質の過酸化は、ある毒性状態、薬剤で誘発される状態、及び病的状態の中で動植物に起こることが知られている過程である[エルストマー・イー・エフ(Elstmer, E.F.)(1982年) Ann. Rev. Plant Phys. 33巻73-96頁; カッバス・エッチ(Kap-pus, H.)(1985年)「酸化ストレス」(エッチ・

ドのウォータースアソシエーツインコーポレーテッドの商標)に投稿し、214nmでモニターした。

使用した溶液系は0.1%トリフルオロ酢酸(緩衝液A)及びのアセトニトリル中の0.08%トリフルオロ酢酸(緩衝液B)であった。30分にわたる0%~60%のBの勾配をペプチドを分離するのに流速2ml/分に於いて使用した。

チオレドキシンはCNBrによって二つの断片、即ちT 1-37及びT 38-188に開裂し、44%及び51%の緩衝液Bで夫々分離した。アミノ酸分析は両方のペプチドの組成を同定し、且つ確認した(ホルムグレン・エー.及びライヒャード・ビー.[1987] Eur. J. Biochem. 2.187-198)。T 1-37は酵素の活性部位を含有していた。回収された二つのペプチドは出発物質の69%に当った。未反応チオレドキシンは損失の12~15%にあたり一方HPLC分離はそれ以外の損失の原因となった。

(b)トリプシン開裂によるT 18-38の製造

上記のHPLC分離の後、T 1-37を集め、乾燥し、酢酸ナトリウム緩衝液中に再懸濁し、NH₄OH

シース編)273-310頁、アカデミックプレス社、ニューヨーク・ロンドン]。脂質の過酸化は脂質ラジカルの形成と伝播、酸基取込み、不飽和脂質中の二重結合の再配置及び膜脂質の最終的破壊を伴い、種々の分解生成物を生ずるが、その一つがマロンジアルデヒドである[前掲カッバス・エッチ(1985年)]。

マロンジアルデヒド(MDA)の形成から評価されるミクロソーム脂質の過酸化は、チオレドキシン(酸化型と還元型)によって抑制された。溶液をすべて、使用前にチレックス(chellex)処理した。ラット肝臓ミクロソーム(ml当たりミクロソームタンパク0.5 mg)、アデノシン二磷酸(ADP)-Fe³⁺(1.7 mM ADP, 0.1 mM FeCl₃)及びニコチンアミドアデニンジヌクレオシド磷酸(NADPH)(0.1 mM)を含有する培養液は、鉄濃度と同じ濃度(すなわち0.1 mM)のチオレドキシンによって抑制された。チオレドキシン濃度を変えて、MDA形成とチオレドキシン濃度との作図で滴定曲線が得られる。曲線の傾斜は比較的急であり、鉄との非常に強い相

互作用を示唆している。酸化還元両型のチオレドキシンが類似行動をとる能力は、ミクロゾームがチオレドキシンを還元する能力と、チオレドキシンがミクロゾームの脂質二重層に結びつく能力とに反映しうる。ODT(0.4及び1.28 mM)は培養混合物中に含まれると、NDA生産量の増加量(それぞれ対照に対して1,016%及び781%)で評価されたとおり、ミクロゾーム脂質の過酸化を促進した。これは、チオレドキシン作用が、他のジチオールではまねのできないほど独特であることを示している。

実施例 3

チオレドキシンはHPLCでの測定のとおり、遷移金属類と相互に作用し合う。鉄が存在すると、本来のチオレドキシンに相当するピークが消え、同時に第二の種が出現する。この第二の種の形成は鉄濃度に依存していた。このように、チオレドキシンは鉄と相互に作用し合って安定な錯体を形成する。結果は、EDTAの飽和力に比肩するか、それよりすぐれた飽和力で、チオレドキシンが鉄とキ

レート化することを示している。同様な結果は、銅の場合にも観察された。

実施例 4

実施例 2と3のチオレドキシンの代わりに実施例 1で得たチオレドキシン断片T₁-37又はT₁8-38、又はT₁1-38(実施例 8)を使用して、本質的に同じ結果が得られる。

実施例 5

実施例 2と3のチオレドキシンの代わりに、酸化還元活性ペプチド配列Cys-X-Y-Cys-Lys、Cys-X-Y-Cys、又はTrp-Cys-X-Y-Cys-Lys(式中XとYは同じもの又は異なるものであり、20種のアミノ酸の任意のものでありうる)を含むチオレドキシンで誘導された、又はチオレドキシン様のジチオールペプチドを使用して、本質的に同じ結果が得られる。

実施例 6

ラジカル形成を予防する能力について、チオレドキシンを鉄つかの鉄キレート化剤(即ちEDTAとデスフェリオキサミン)と比較した。鉄触媒によ

るヒドロキシル基の形成(ヒポキサンチン及びキサンチンオキシダーゼによりO₂・として発生)を、ジメチルスルホキシドとの反応によるホルムアルデヒドの形成によって監視した【グラフ・イー(Graf, E.)ら(1984年) J. Biol. Chem. 259巻3820-3824頁】。50 mMトリリス(pH7.4)、50 μ M Fe²⁺、250 μ Mキレート化剤(又はチオレドキシン)、50 mMジメチルスルホキシド、300 μ Mヒポキサンチン及びキサンチンオキシダーゼ18ミリ単位のトリブレート1.0 ml試料を37℃で30分培養した。溶液をすべて、使用前にチェレックス(chellex)カラムに通した。キサンチンオキシダーゼの添加によって反応を開始し、100%トリクロロ酢酸50 μ lの添加によって終了させた。ホルムアルデヒドをハンチ(Hantzsch)反応【ナッシュ・ティエ(Nash, T.) (1953年) Biochem. J. 55巻416-421頁】により比色法で決定した。チオレドキシン(酸化型と還元型)及びデスフェリオキサミンは250 μ Mで、ホルムアルデヒドが検出されないまでに鉄の全触媒活性を抑制した。一方、250 μ MのEDTAは、対照(キ

レート化剤なし)の30分当たりホルムアルデヒド28.9 \pm 1.3 nmolに比べて、30分当たりのホルムアルデヒド7.1 \pm 0.8 nmolの率を与えた。このように、チオレドキシンはラジカル形成の抑制にデスフェリオキサミンとして行動するが、EDTAにはそのような行動はできない。

実施例 7

チオレドキシンは、鉄触媒による経過酸化物に依存する脂質過酸化系においてアラキドン酸メセルの過酸化を抑制した。すべての培養は、外來金属イオンを除くために、使用前にチェレックス(chellex)で処理された。培養液はアラキドン酸(0.08% w/v LUBROL-PX[シグマ・ケミカル社、ミズーリ州セントルイス])を加えた懸濁液中0.2 mg/ml、アデノシン二磷酸(ADP)-Fe²⁺(0.5 mM ADP, 0.1 mM FeCl₂)、0.33 mMキサンチン及びキサンチンオキシダーゼ(0.1単位/ml)を含有した。NDA形成は、鉄と同じ濃度(すなわち0.1 mM)のチオレドキシン(酸化又は還元型)によって完全に抑制された。NDA形成の抑制は、酸化型チオレドキ

シン濃度と直線的に比例していた。デスフェリオキサミンを使用して同様な曲線が生じ、0.1 mM MDAで抑制率は100%であった。還元型チオレドキシンを使用して同様な曲線が生じたが、約0.05 mM チオレドキシンで抑制率は100%であった。酸化型チオレドキシンが濃度依存的なMDA形成の低下をもたらす能力は、(1)超過酸化物質又は第一鉄イオンの形成(超過酸化物質の第二鉄イオン還元を經由)が酸化型チオレドキシンを還元し、これが今度は鉄をキレート化する；又は(2)酸化型チオレドキシンがスルフヒドリル又は他のアミノ酸残基、すなわちトリプトファン、ヒスチジン等を通してラジカル除去剤として働く、という事実のためであろう。還元されたチオレドキシンと、ヨードアセトアミドでカルボキシメチル化されたチオール類は、0.1 mMで23%の抑制率というわずかな濃度依存的なMDA形成の抑制をもたらした。この結果は、還元型チオレドキシンが活性部位のスルフヒドリルを経て鉄との相互作用を通して脂質の過酸化を抑制することを強く示唆している。チオレドキシ

ンのこの働きは類のないものである。というのは、チオール化合物類(すなわちシステイン、グルタチオン、GDT)が脂質の過酸化を起こし、かつ促進することが、文献に記述されているからである[ローリー・ディー・エイ(Rowley, D.A.)及びハリウェル・ビー(1982年) FEBS Lett. 138巻33-66頁；バッチャー(Bucher)ら(1982年)「オキシラジカルとその除去系」(Oxy Radicals and Their Scavenger Systems)1巻370-383頁(コーエン・ジー及びグリーンウールド・アール・エイ編)；ティーン(Tien)ら(1982年) Biochem. Biophys. Res. Comm. 107巻279-285頁]。

還元型チオレドキシンがデスフェリオキサミンより有効(約2倍)であることは、注目しよう。デスフェリオキサミンは鉄のキレート化によって抑制するから、還元型チオレドキシンは鉄のキレート化とは別の、又はそれに加えて、何らかの酸化防止作用をもっているに違いない。

実施例8

実施例7に記載のように、大腸菌チオレドキシ

ン活性部位の配列をもつジチオールペプチドを使用して脂質過酸化研究を実施した。ペプチドT₂₁₋₃₈のTrp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lysは、メリフィールド(Herrifield) J. Am. Chem. Soc. (1964年)85巻2149頁に記載されたような慣用の固体相手順によって合成された。T₂₁₋₃₈ペプチドが脂質過酸化を抑制する能力は、無傷のタンパクの効力と同様であった。酸化型ペプチドはペプチド濃度に比例して(すなわち酸化型チオレドキシンとデスフェリオキサミンで観察されるとおりに)MDA形成を抑制した。還元型ペプチドは約0.05 mMで(すなわち還元型チオレドキシンで観察されるとおりに)MDA形成を完全に抑制した。

また本発明の範囲には、チオレドキシン化合物類のナトリウム又はカリウム塩、又はグアニジンのような有機強塩基との塩類のような薬学的に受け入れられる塩類も含まれる。そのほか、これらの陽イオンの、並びにチオレドキシン化合物中のリシン残基のカウンターイオン類、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、マレイン酸塩、

酢酸塩、くえん酸塩、安息香酸塩、こはく酸塩、りんご酸塩、アスコルビン酸塩等も、製剤中に包含できる。

また本発明の範囲には、ジチオール配列の(Trp)-Cys-X-Y-Cys-Lysを含有し、アミノ及び/又はカルボキシル封鎖基、特に荷電を中性にするような基をもったペプチドが含まれる。アミノ封鎖基の例はアシル1-18C、例えばアセチル及び第三ブトキシカルボニルを包含する。カルボキシル封鎖基は低級アルキルエステル類、例えばエチル及びメチル、及びアミド基を包含する。

アシル類は、当業者に周知の標準的なアシル化条件を用いてつくることができる。アシル化に使用される酸類は以下を包含する。(a)飽和又は不飽和の直鎖又は分枝鎖脂肪酸カルボン酸、例えば酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸、第三ブチル酢酸、古草酸、イソ古草酸、カブロン酸、カプリル酸、デカン酸、ドデカン酸、ラウリン酸、トリデカン酸、ミリスチン酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、アク

リル酸、クロトン酸、ウンデシレン酸、オレイン酸、ヘキシン酸、ヘプチン酸、オクタン酸等；(b)飽和又は不飽和の脂環式カルボン酸類、例えばシクロブタンカルボン酸、シクロペンタンカルボン酸、シクロペンテンカルボン酸、メチルシクロペンテンカルボン酸、シクロヘキサンカルボン酸、ジメチルシクロヘキサンカルボン酸、ジブロビルシクロヘキサンカルボン酸等；(c)飽和又は不飽和脂環式脂肪族カルボン酸、例えばシクロペンタン酢酸、シクロペンタンプロピオン酸、シクロヘキサン酢酸、シクロヘキサン酪酸、メチルシクロヘキサン酢酸等；(d)芳香族カルボン酸、例えば安息香酸、トルイル酸、ナフトエ酸、エチル安息香酸、イソブチル安息香酸、メチルブチル安息香酸等；及び(e)芳香族脂肪族カルボン酸、例えばフェニル酢酸、フェニルプロピオン酸、フェニル古草酸、桂皮酸、フェニルプロピオール酸、及びナフチル酢酸等。

出願人 レブリゲン コーポレーション

代理人 弁護士 佐々井秀太郎 (外1名)